

Evaluation biologique des produits dentaires

G. SCHMALTZ, R. STARKMANN-POLTZ

Introduction

L'évaluation biologique des produits dentaires peut être réalisée soit cliniquement sur des patients, soit précliniquement en expérimentation animale soit enfin à l'aide de cultures cellulaires. Dans ce travail, nous nous en tiendrons aux essais précliniques. Les informations obtenues par ces essais sont nécessaires à l'estimation du risque que ces biomatériaux font courir avant de passer à leurs applications à l'homme.

La base d'une telle estimation du risque est fondée sur :

1. les résultats des recherches biologiques précliniques,
2. les données sur les qualités thérapeutiques établies, le plus souvent sur les propriétés physico-chimiques et
3. des données sur l'assurance de qualité de la production.

Les expérimentations biologiques portant sur les matériaux dentaires donc ne définissent seulement qu'un seul aspect des matériaux. Cette information n'est pas seulement nécessaire pour l'estimation du risque, mais, elle permet de se protéger des réactions indésirables. Par exemple, l'emploi du ciment au silicate, au temps où la technologie des résines composites n'avait pas atteint son développement actuel, a été recommandé en dépit de son effet très nocif pour la pulpe — parce que par l'usage d'un fond de cavité approprié il permettait d'éviter une réaction indésirable de la pulpe (9).

Méthodes standardisées

Les examens biologiques, précliniques peuvent être effectués premièrement par des méthodes d'essais standardisés ou par des méthodes d'essais non-standardisés.

Les méthodes d'essais standardisés ont été définies par les commissions nationales (A.D.A (2), A.F.N.O.R (1), D.I.N (4)) et internationales (I.S.O, F.D.I (5)). L'emploi de telles méthodes d'essai présente l'avantage, de pouvoir comparer — du moins en ordre de grandeur — les résultats de différents laboratoires. En outre, on s'assure d'un certain niveau de qualité des essais.

Toutefois ces méthodes d'essais standardisés ne peuvent pas dans tous les cas tenir compte de toutes les questions que l'on peut être amené à se poser au cours de l'étude d'un matériau récemment élaboré.

A cause de la bonne comparabilité des résultats, nous préférons normalement les méthodes d'essais standardisées, à l'exception des cas où l'on ne peut pas les employer de façon appropriée, ce qui reste toujours possible.

G. Schmaltz, Professeur; R. Starkmann-Poltz; Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie; Université de Ratisbonne, R.F.A.

Données du rapport technique 7405

Les méthodes d'essais standardisés, classifiés par l'I.S.O dans le rapport technique 7405 (5), servent de base pour ceux de l'A.F.N.O.R (1), D.I.N (4) et A.D.A (2). cependant, pour les protocoles de l'A.D.A et du D.I.N, quelques modifications ont été effectuées.

Le rapport technique de I.S.O 7405 subdivise les méthodes d'essai en trois groupes :

1. essais initiaux
2. essais de deuxième niveau
3. essais d'usage.

Outre la vue d'ensemble qu'elle offre, cette classification peut aussi permettre au fabricant de choisir les essais appropriés à un produit nouveau. D'abord, on accomplira normalement les essais initiaux. Les matériaux, qui franchissent avec succès les premières étapes seront soumis aux essais de deuxième niveau. Si ceux-ci sont également concluants, les essais d'usage, qui sont très chers, peuvent suivre. Quelques exceptions dans le déroulement de ce protocole sont toujours possibles. Dans chaque groupe d'essais, on envisage des risques différents. Pour chaque risque, il existe plusieurs méthodes différentes d'appréciation. C'est pourquoi pour chaque matériau nouveau, des experts sont responsables du choix des essais nécessaires pour le produit dans chaque groupe.

Les essais initiaux

Dans ce groupe (Tableau I), on inclut tous les expérimentations relatives à la toxicité générale; ce qui permet de répondre à des questions de cet ordre : quelle est la dose léthale (DL). En général, on obtient cette information avec des animaux d'expérimentation et par la définition de la DL 50. La DL 50, la dose léthale moyenne, indique la concentration d'une substance qui est statistiquement responsable de la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée. Le groupe des essais initiaux comprend aussi les essais d'inhalation, de mutation (Ames-Test et mutation dominante léthale) et de cytotoxicité.

Les essais de cytotoxicité comprennent des méthodes différentes.

1. Méthode par libération de Cr^{51} .
2. Méthode du filtre moléculaire.
3. Méthode de diffusion dans la gélose (Agar Diffusion).
4. Essai d'hémolyse.

Dans l'essai par diffusion dans l'Agar (9) on applique les matériaux sur de la gélose (fig. 1) et sous cette couche de gélose se trouvent des cellules de fibroblastes. Ces cellules sont colorées avec du rouge neutre (fig. 2).

Tableau I. — Essais initiaux.

- Essai de toxicité générale
- Essai d'inhalation
- Essai d'hémolyse
- Essai d'Ames
- Essai de mutation dominante léthale
- Essai de cytotoxicité

La toxicité est évaluée par la surface de la zone décolorée sous ou autour de l'échantillon, que l'on évalue (fig. 3). On peut aussi analyser les cellules et surtout on peut apprécier l'étendue de la lyse cellulaire (fig. 4).

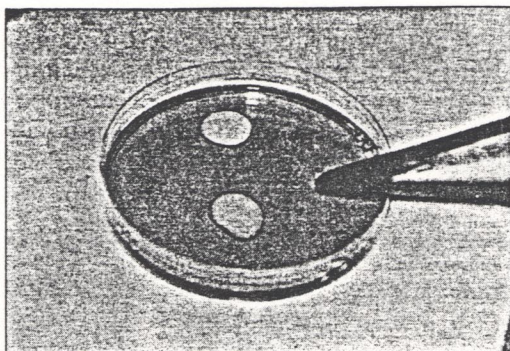


Figure 1. — Essai de cytotoxicité (Agar-Diffusion) : application des échantillons d'essai sur la gélose.

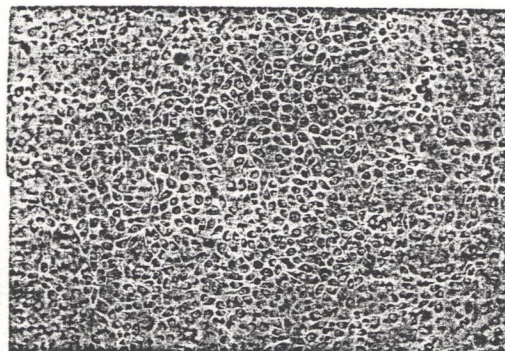


Figure 2. — Monocouche de cellules (L-929 Fibroblasts); 27x.

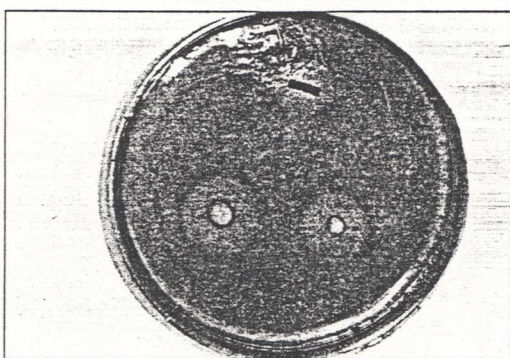


Figure 3. — La surface de la zone de décoloration constitue une mesure de la cytotoxicité.

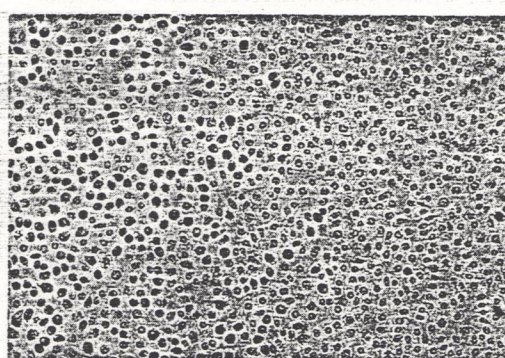


Figure 4. — Réaction cellulaire (cell-lyse) sur un échantillon d'essai; 27x.

Les essais de deuxième niveau

Ce groupe comprend essentiellement des expérimentations pratiquées sur des animaux (tableau II). Dans l'essai d'implantation sous-cutanée, on place soit la substance elle-même, soit le produit contenu dans des tubes de polytétrafluoréthylène (P.T.F.E) dans le tissu sous-cutané de rats (fig. 5). Quatre échantillons par essai sont implantés dans chaque animal (fig. 6). Après 14 jours le tissu est excisé et préparé de la manière habituelle pour l'examen histologique (10, 12). La figure 7 montre la réaction du tissu conjonctif à un produit pour empreintes à base de silicone polymérisant par condensation. On peut reconnaître la présence d'une tuméfaction bien distincte chez l'animal, qui s'étend sur l'extrémité des tubes de P.T.F.E, au site de contact du tissu conjonctif avec le produit à évaluer. Les sections histologiques (fig. 8) révèlent dans la zone de contact du produit avec le tissu, une accumulation massive de cellules inflammatoires, indication de la réaction très prononcée du tissu au produit que l'on évalue. En comparaison, la figure 9 illustre la réaction envers un silicone polymérisant par addition. Il n'y a pas de réaction inflammatoire (13).

Un test très important entrant dans le cadre des essais de deuxième niveau porte sur la sensibilisation, telle que l'ont décrit Magnusson et Kligman (8).

Durant la première phase d'induction, le produit est appliqué sur la peau d'un animal d'expérience ou injecté par voie sous-cutanée (fig. 10). 14 jours après, on effectue un test de provocation. On procède à l'examen d'une autre région. Si l'animal utilisé pour l'expérimentation est sensibilisé, le nouveau contact avec le produit provoque plus qu'une légère réponse inflammatoire et on peut parler de sensibilisation. Quelques produits dentaires ont montré un résultat positif dans cet essai (6).



Figure 5. — Essai d'implantation sous-cutanée : application des échantillons d'essai.

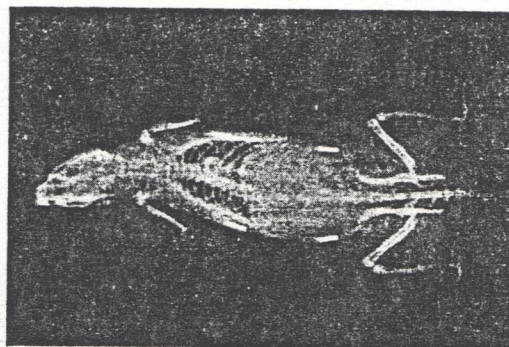


Figure 6. — Quatre implants sont placés.

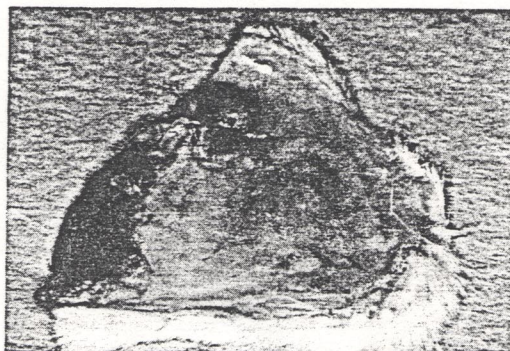


Figure 7. — Réaction macroscopique sévère envers un silicone polymérisant par condensation.



Figure 8. — Réaction microscopique sévère envers un silicone polymérisant par condensation; 21x.



Figure 9. — Réaction microscopique (pas d'inflammation) envers un silicone polymérisant par addition; 21x.



Figure 10. — Essai de sensibilisation : phase d'induction (gracieusement mis à disposition par le Dr A. Hensten-Pettersen, NIOM).

Les essais d'usage

Les essais d'usage (tableau III) représentent une part essentielle des méthodes d'essais standardisés. Bien qu'elles soient extrêmement dispendieuses, elles offrent beaucoup d'avantages en comparaison avec toutes les autres méthodes d'essai, essentiellement parce qu'on teste les matériaux dentaires exactement comme ils seront utilisés plus tard chez l'homme. La réaction biologique s'évalue par l'examen des organes qui sont aussi potentiellement en danger chez l'homme.

De cette façon, par exemple, dans l'essai d'usage d'un produit pour restauration, on contrôle l'influence de ce matériau sur les pulpes des animaux d'expérimentation (7). Des animaux spécifiquement utilisés pour ces tests sont par exemple des singes (7) ou des porcs miniatures (15).

Tableau II. — Essais de deuxième niveau.

- Essai d'implantation sous-cutanée
- Essai d'implantation endo-osseuse
- Essai de sensibilisation
- Essai d'irritation de la muqueuse buccale

Tableau III. — Essais d'usage.

- Essai d'irritation de la muqueuse buccale
- Essai pulpaire
- Essai de coiffage pulpaire et de pulpotomie
- Essai d'usage endodontique
- Essai d'usage d'implant osseux



Figure 11. — Phase de provocation (gracieusement mis à disposition par le Dr A. Hensten-Pettersen, NIOM).



Figure 12. — Réaction envers une substance sensibilisante (gracieusement mis à disposition par le Dr A. Hensten-Pettersen, NIOM).

Pour ces observations des cavités cervicales sont préparées et des matériaux d'essai sont appliqués (fig. 13). Les temps d'observations post-opératoires sont de 3-5 jours, 30 jours ou 90 jours. Après l'extraction des dents, la pulpe est préparée histologiquement.

L'évaluation de la réaction est réalisée suivant les critères définis comme semi-quantitatifs selon une réponse graduée. La figure 14 illustre la réaction pulpaire envers un ciment au verre ionomère. On peut reconnaître une réaction inflammatoire très prononcée. Mais ces expérimentations ne se limitent pas seulement à l'évaluation de la réaction du produit sur la pulpe. Elles prennent aussi en compte celle du fond de la cavité. Par exemple il faut cerner l'effet de la présence ou de l'absence d'une contamination bactériologique. Ainsi nous avons trouvé (16), que la réaction de la pulpe envers un ciment au verre ionomère n'est pas relative au seul matériau, mais est due à la présence d'une couche bactérienne sous le matériau (fig. 15). Si l'on a évité, du fait d'une obturation étanche, une telle pénétration,

on n'observe pas de réaction, ou seulement des réactions insignifiantes (16). Les expérimentations d'usage ont tout aussi bien montré des réactions pulpaires envers un amalgame d'argent (14). Après cinq jours il y a une altération dans la couche d'odontoblastes (fig. 16). Au bout de 90 jours, la réaction est devenue seulement modérée (fig. 17). Au contraire, la figure 18 illustre une réaction sévère déclanchée par une résine composite utilisée avec la technique du mordantage acide, après 90 jours sans protection propre de la pulpe/dentine (14).

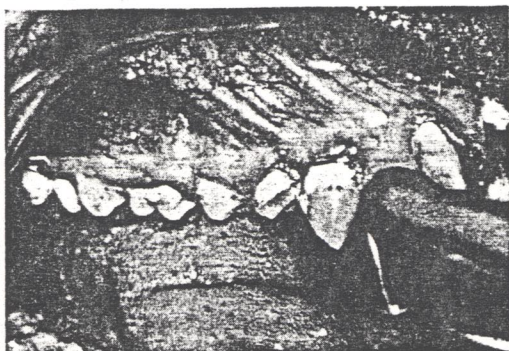


Figure 13. — Essai d'usage : application des échantillons par essai dans les cavités cervicales.

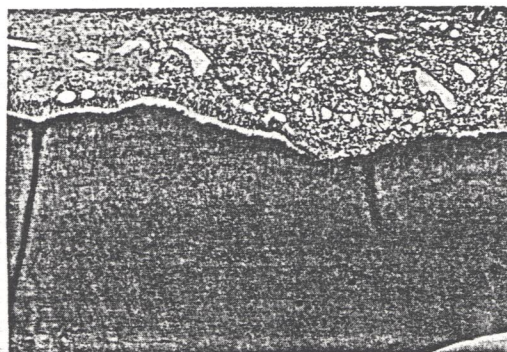


Figure 14. — Réaction pulpaire sévère envers un ciment au verre ionomère; 21x.

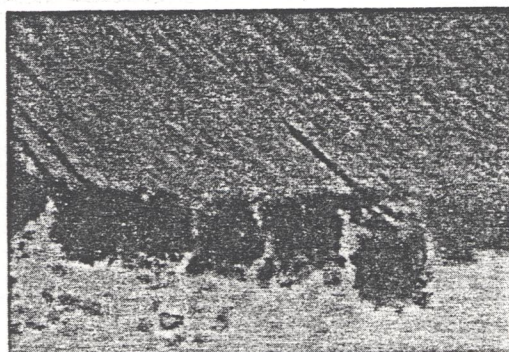


Figure 15. — La couche bactérienne au fond de la cavité est la cause de la réaction pulpaire; 540x.



Figure 16. — Réaction pulpaire modérée envers un amalgame, 5 jours après l'insertion; 21x.



Figure 17. — Réaction pulpaire faible (pas d'inflammation) envers un amalgame, 90 jours après l'insertion; 21x.



Figure 18. — Réaction pulpaire sévère envers une résine composite avec la technique de mordantage acide, 90 jours après l'insertion sans protection de la pulpe; 21x.

Conclusions

Dans ce bref exposé un petit secteur de la gamme des méthodes d'essai biologiques courantes aujourd'hui peut être seulement présenté. Il faut surtout souligner :

1. Que chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Ce n'est que par la combinaison des différentes méthodes que l'on peut essayer de dessiner un profil de la toxicité d'un produit dentaire (3).
2. Il n'est pas seulement important de dégager l'influence des matériaux sur le tissu vivant, en tant que phénomène, mais il importe aussi d'en comprendre les mécanismes de réaction.
3. Ces informations constituent une base destinée à l'extrapolation pour l'homme des résultats obtenus par l'expérimentation animale et ceux obtenus in vitro. Cependant il est difficile de transférer directement à l'homme les résultats obtenus par l'expérimentation animale ou in vitro.
4. Il est possible d'établir une bonne corrélation ($r = 0,6 - 0,8$) entre les résultats des expérimentations en culture cellulaire et ceux des implantations (11), surtout si l'on dispose d'une série de matériaux présentant une toxicité très différente. Il est également possible d'établir une corrélation entre les résultats des essais d'usage et sur l'homme (7). Mais il est difficile — et en principe inopportun — d'essayer d'établir une corrélation entre les résultats de la culture cellulaire et de l'implantation d'une part et des essais d'usage (par exemple l'essai pulpaire) ou la réaction sur l'homme d'autre part. Car dans les expérimentations sur cultures cellulaires on mesure seulement la cytotoxicité, dont la cause sont des substances qui s'échappent hors d'un matériau. Au contraire, dans les expérimentations d'usage on mesure l'irritation, qui peut avoir des causes différentes, par exemple la toxicité, mais aussi l'absence d'étanchéité ou encore le dégagement de chaleur pendant la polymérisation (9). Cependant, les essais de culture cellulaire et d'implantation sont utiles pour clarifier le mécanisme de l'agression. Par exemple si l'on étudie la question de savoir, pourquoi un ciment au verre ionomère nuit à la pulpe, il apparaît que l'absence de cytotoxicité fournit une première indication et reporte sur la présence de bactéries les facteurs d'irritation.
5. Enfin l'information biologique doit être interprétée par un spécialiste, dans le cadre des examens d'agrément gouvernementaux ou du cabinet du dentiste. En Allemagne Fédérale, tous les produits nouveaux destinés aux restaurations dentaires doivent subir des examens d'agrément effectués par une agence gouvernementale.

Bibliographie

1. Association Française de Normalisation : Evaluation biologique des produits dentaires. Document S 91-224, 85058.
2. American Dental Association : ANSI-ADA-document n° 41 for biological evaluation of dental materials. ADA, Chicago, U.S.A.
3. DILLINGHAM (E.O.), WEBB (N.), LAWRENCE (W.H.), AUTIAN (J.). — Biological evaluation of polymers. I. (poly)methylacrylate. *J. Biomed. Mat. Res.* 9 : 569, 1975.
4. DINV 13930, Deutsches Institut für Normung, Aussenstelle Pforzheim, Westliche 56.

5. Fédération Dentaire Internationale : Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. ISO-TR 7405. *Int. Dent. J.* 30 : 140, 1980.
6. HENSTEN-PETTERSEN (A.), STAVIK (D.), WENNBERG (A). — Allergenic potential of root canal sealers. *Endod. Dent Traumat.* 1 : 61, 1985.
7. KLÖTZER (W.T.), LANGELAND (K.). — Tierexperimentelle Prüfung von Materialien und Methoden der Kronen-und Brückenprothetik. *Schweiz Mschr Zahnheilk* 83 : 163, 1973.
8. MAGNUSSON (B.), KLIGMAN (A.M.). — The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermat.* 52 : 268, 1969.
9. SCHMALZ (G.). — Die Gewebeverträglichkeit zahnärztlicher Werkstoffe — Möglichkeit der Prüfung in der Zellkultur. Thieme, Stuttgart, 1981.
10. SCHMALZ (G.), SCHMALZ, C.H.R. — Toxicity tests on dental filling materials. *Int. Dent. J.* 31 : 185, 1981.
11. SCHMALZ (G.). — Korrelationsanalysen zwischen Zellkulturen und Tierversuch. *Dtsch Zahnärztl Z.* 37 : 184, 1982.
12. SCHMALZ (G.), BÜHLER (J.J.). — Toxizitätsprüfungen von Füllungsmaterialien im Ratten-Implantationstest. *Dtsch Zahnärztl Z.* 38 : 254, 1983.
13. SCHMALZ (G.), MERKLE (D.). — Die lokale toxische Wirkung von Abdruckmaterialien. *Zahnärztl Praxis* 36 : 13, 1985.
14. SCHMALZ (G.). — Biologische über einen Kavitäten Liner. *Zahnärztl Welt* 94 : 624, 1985.
15. SCHMALZ (G.). — The use of miniature pigs for pulp studies. *J. Dent. Res.* 65 : 749, 1986.
16. SCHMALZ (G.), SCHMALZ C.H.R., ROTGANS (J.) — Die Pulpaverträglichkeit eines Glasionomer — und eines Zinkoxiphosphatzementes. *Dtsch Zahnärztl Z.* 41 : 806, 1986.

Remerciements

Nous remercions le Pr Dr Michel Goldberg pour son aide linguistique dans la préparation de ce texte.